

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-7188

(43)公開日 平成6年(1994)1月18日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/06		8214-4B		
A 2 3 L 1/305				
// A 6 1 K 37/18	ABU	8314-4C		
C 1 2 N 9/99				

審査請求 未請求 請求項の数2(全 4 頁)

(21)出願番号 特願平4-167753

(22)出願日 平成4年(1992)6月25日

(71)出願人 391030572

日本食材加工株式会社

宮崎県宮崎市青葉町66番地

(72)発明者 井口 喬

宮崎県宮崎市青葉町66番地 日本食材加工

株式会社内

(72)発明者 杉田 浩一

宮崎県宮崎市青葉町66番地 日本食材加工

株式会社内

(54)【発明の名称】 ペプチド含有食品製造法

(57)【要約】

【目的】 限外濾過膜と逆浸透膜を用いて血圧降下作用を有するアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物を得る。

【構成】 動物、植物、魚介類のタンパク質を市販酵素剤と組織に含まれている酵素をそれぞれ単独及び両者を併用して反応し、反応中の分解物を限外濾過膜により連続的に濾過し、さらにその濾過液中に存在するアンジオテンシン転換酵素の阻害とは無関係の、遊離アミノ酸、その他低分子成分を逆浸透膜で濾過することにより除去し、阻害活性の高いアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物を得る。またこのペプチド混合物を含む食品を製造することにより、簡単にアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチドを摂取できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動植物または魚介類のタンパク質を酵素分解し、その反応中の液を限外濾過膜で連続的に濾過した濾液を逆浸透膜でさらに濾過することを特徴とするアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物の製造法。

【請求項2】 請求項1で示したアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物を含有することを特徴とする食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物の製造法とそれを利用した食品に関する。アンジオテンシン転換酵素は生体内で血圧上昇ペプチドであるアンジオテンシンⅠⅠを生成する酵素であるので、本発明で製造した食品は血圧降下作用を有した機能性食品として利用でき、高血圧を抑制できる。

【0002】

【従来の技術】 高血圧症は近年患者数が増加している疾病の一つであり、効果的な予防、治療法の開発が望まれている。生体内での血圧の調節には様々なメカニズムが関与しているといわれるがそのうちの一つにレニン・アンジオテンシン系が知られている。

【0003】 レニン・アンジオテンシン系は血圧を上昇させる調節系である。腎臓で生成される酵素であるレニンが、血管中でアンジオテニンノーゲンに作用してアミノ

酸10個からなるペプチドであるアンジオテンシンⅠ

(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)を生成する。アンジオテンシン転換酵素の作用により、アンジオテンシンⅠのC末端からジペプチドHis-Leuが遊離し、アミノ酸8個からなるアンジオテンシンⅡ(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)が生成する。アンジオテンシンⅡは血管平滑筋を収縮させて血圧を上昇させ、副腎皮質からアルドステロンを分泌させ、腎臓でナトリウムを再吸収させることによって血圧を上昇させる。

【0004】 血圧を下げるメカニズムとしては、カリクレイン・キニン系が知られているが、ここで生成するキニンは、血管を拡張することによって血圧を降下させる。しかしながらこのキニンはアンジオテンシン転換酵素の作用により分解するので血圧降下が抑制される。

【0005】 このようにレニン・アンジオテンシン系とカリクレイン・キニン系の両者においてアンジオテンシン転換酵素は血圧を上昇させる。したがってアンジオテンシン転換酵素を阻害することによって血圧上昇を抑える試みがなされている。また、近年各種のタンパク質由来のペプチドにアンジオテンシン転換酵素の阻害作用があることがわかってきている。例えば特開平2-240027にはトウモロコシタンパク質由来のLeu-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro

がアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチドとして記載されており、また特開平3-81291ではナンキョクオキアミの組織からLeu-Lys-Tyrを、特公昭61-51564では牛由来のカゼインからThr-Thr-Met-Pro-Leu-Trpを分離している。一方アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチドを含有する混合物やその製法については特開平2-240028のゼインまたはグルテンミールを酵素分解し、分子量10000以下の画分をゲル濾過や限外濾過により得る方法や、特開平2-282394のいちじく由来の分子量10000以下の物質を含有する液、特開昭62-28370の魚肉タンパク質を加水分解して分子量分画する方法等が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする問題点】 しかしながらこれらアンジオテンシン転換酵素を含有する画分には塩、遊離アミノ酸、などアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチドより分子量が小さく、阻害作用のない成分が含まれている。これら低分子量成分を除去すればアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド含有画分の酵素阻害比活性が上昇することが期待される。したがってこれら低分子量成分の簡便で効果的な除去方法が求められている。低分子量成分を除去する方法としてはゲル濾過で行う方法があるが、カラムの処理量が少なく、カラムへのゲルの充填など操作が複雑である。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決するために種々検討した結果、本発明を完成するにいたった。

【0008】 すなわち、本発明は、効率よく効果的にアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物を分離濃縮する方法である。

【0009】 本発明で言うアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物は動植物または魚介類のタンパク質を酵素で分解し、その後限外濾過膜処理、逆浸透膜処理によってアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチドを濃縮することにより得られる。酵素分解は市販のタンパク質分解酵素または動植物の組織に含まれている酵素による分解のどちらか一方または両者を組合せて使用する事が出来る。酵素分解後は限外濾過により分画分子量3000~10000の膜で濾過し、透過液を逆浸透膜濾過により塩や遊離アミノ酸、その他の低分子量成分を除去し、アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物を得る。また濾過膜不透過液を酵素分解し、分子量を小さくすることにより膜透過性を上げ、アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物の収率を上昇させたり、比活性を上昇させることも出来る。

【0010】 本ペプチドの材料としては牛肉タンパク質、豚肉タンパク質、鳥肉タンパク質、魚介類タンパク質、野菜タンパク質等が使用出来る。酵素としては、ア

ルカラーゼ（ノボインダストリー）、ニュートラーゼ（ノボインダストリー）、サモアーゼ（大和化成）、アクチナーゼ（科研製薬）、モルシン（盛進製薬）などが使用出来るが本発明はこれらの酵素に限定されるわけではない。本ペプチドの使用にあたっては単独であるいは食品に加工して摂取できる。

#### 【0011】

【実施例1】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

【0012】反応槽に豚の挽肉10Kgを添加し、水135Kgを加え水酸化ナトリウム溶液でpHを9.0に調整し、温度を55℃にしてからアルカラーゼ0.6L（ノボインダストリー）375gを加え、攪拌しつつ酵素分解した。酵素分解開始後、15分後に酵素反応液を限外濾過ラボモジュールSIP-1013（旭化成製）で連続的に濾過を行った。未濾過液は反応槽にもどしながら反応させ、反応中は4N水酸化ナトリウム液でpH9.0に調節した。またモジュールの入口には200メッシュのフィルターを付け固形物の侵入を防ぎ、入口圧は1.3Kg/cm<sup>2</sup>、出口圧は0.7Kg/cm<sup>2</sup>で行った。こうして酵素反応開始4時間後に濾過液50.5Kgを得た。不透過液83.6Kgは4N塩酸でpHを7.5に調節し、アクチナーゼAS（科研製薬）3.0gを加え45℃で4時間酵素分解した。分解中は限外濾過モジュールSIP-1013で連続的に濾過し、濾液49.3Kgを得た。そして限外濾過液を合わせ逆浸透膜SU620（東レ製）により逆浸透圧濾過を行い、36Kgの不透過画分を得、これをアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物とした。この液は固形物を3.2Kg含有していた。

【0013】アンジオテンシン転換酵素阻害の測定は、L-ヒプリルヒスチジルロイシンを基質とし、ウサギ肺由来のアンジオテンシン転換酵素を用いる方法で行った。ガラス製試験管にpH8.3の300mM塩化ナトリウム含有100mMホウ酸緩衝液280μlに溶解した本発明ペプチド混合物入れ、10分間37℃で加温した。この基質液にウサギ肺アセトンパウダー（シグマ

製）1gに100mMホウ酸緩衝液（pH8.3）30mlを加え、よく攪拌した後30000Gで20分遠心分離した上清をアンジオテンシン転換酵素として100μlを加え37℃で30分酵素反応させた。酵素反応を1N塩酸250μlを加え停止させ、酢酸エチル（和光純薬製紫外吸収スペクトル用）1.5mlを加え、15秒間振とうさせて酵素反応で生じた馬尿酸を抽出し、2500rpmで、10分間遠心分離を行い酢酸エチル層1.0mlをガラス製試験管に採取した。酢酸エチルをホットドライバスの中で120℃、30分間加温して完全に除去した後、蒸留水を加え、島津製作所製UV-160-02を用いて228nmの吸光度を蒸留水に対して測定し、酵素反応で生じた馬尿酸の量を求めた。

【0014】アンジオテンシン転換酵素の阻害率は阻害ペプチド混合物を添加しないで馬尿酸の生成量を測定した時の吸光度をBとし、本発明阻害ペプチドを添加して測定した時の吸光度をSとした場合、阻害率（%）＝（B-S）÷Bで求めた。なお阻害ペプチドを添加しない時の酵素の活性は8mUであった。

【0015】この条件でアンジオテンシン転換酵素阻害活性を測定すると豚挽肉酵素分解開始15分後の限外濾過開始前液では酵素の活性を50%阻害する値であるIC<sub>50</sub>は固形物1000μg/mlであるのに対し、SIP1013透過液では630μg/mlで、本発明のアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド液では21μg/mlであり、より少量でアンジオテンシン転換酵素を阻害することが出来た。

#### 【0016】

【実施例2】実施例1で製造した豚肉由来アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物を表1～4に示す割合で他材料と混合し、半固形食品を製造した。また、それぞれカラギナンを添加しないものも製造し、飲料とした。このようにしてアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチドを含有する食品を提供することにより日常的にアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを提供することが出来た。

表1

アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物	30.0%
牛乳	43.7%
バナナ果汁	10.0%
はちみつ	15.0%
ビタミン混合液（V. A <sub>1</sub> 、V. B <sub>1</sub> 、V. B <sub>2</sub> 、V. D の各0.2%含有液）	1.0%

カラギナン

0.3%

表2

アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物	30.0%
発酵牛乳	43.7%
リンゴ果汁	10.0%
はちみつ	15.0%

ビタミン混合液 (V. A <sub>1</sub> 、V. B <sub>1</sub> 、V. B <sub>2</sub> 、V. D 0.2%含有液)	1.0%
カラギナン	0.3%
表3	
アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物	30.0%
発酵牛乳	43.7%
コーンパウダー	10.0%
ビタミン混合液 (V. A <sub>1</sub> 、V. B <sub>1</sub> 、V. B <sub>2</sub> 、V. D 0.2%含有液)	1.0%
水	15.0%
カラギナン	0.3%
表4	
アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド混合物	30.0%
牛乳	43.7%
カボチャパウダー	10.0%
ビタミン混合液 (V. A <sub>1</sub> 、V. B <sub>1</sub> 、V. B <sub>2</sub> 、V. D 0.2%含有液)	1.0%
水	15.0%
カラギナン	0.3%

【0017】

【発明の効果】以上説明したとおり、本発明によれば限外濾過膜処理と逆浸透膜処理により、血圧上昇を抑える作用を有するアンジオテンシン転換酵素阻害能が上昇

し、ペプチド液が効率よく得られる。また、それを使用した食品によりアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチドを手軽に摂取することが出来る。